

⑫ 公開特許公報(A) 平1-203046

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)8月15日

B 01 J 49/00

A 61 K 9/08

B 01 J 49/00

G 01 N 30/50

Z-8017-4G

L-7417-4C

D-8017-4G

7621-2G 審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 樹脂担体からパイロジェンを除去する方法

⑰ 特 願 昭63-23966

⑱ 出 願 昭63(1988)2月5日

⑲ 発 明 者 佐 伯 純 栃木県宇都宮市江曾島町1348-1番地

⑲ 発 明 者 石 田 誠 司 栃木県下都賀郡石橋町大字下古山231番地

⑲ 発 明 者 佐 々 木 國 夫 栃木県宇都宮市上横田町762-7番地

⑲ 発 明 者 生 沼 俊 夫 栃木県小山市大字田川976番地

⑲ 発 明 者 川 島 利 行 栃木県下都賀郡石橋町石橋58-2番地 松原マンション

⑲ 発 明 者 熊 沢 栄 太 郎 栃木県小山市天神町1丁目4番25号 一徳ハイツ2-612号

⑳ 出 願 人 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 舟橋 榮子

明 細 書

1. 発明の名称

樹脂担体からパイロジェンを除去する方法

2. 特許請求の範囲

(1) イオン交換クロマトグラフィー用の樹脂担体を洗浄するに際し、溶出液の塩濃度を段階溶出で変化させることを特徴とするイオン交換クロマトグラフィー用の樹脂担体からパイロジェンを除去する方法。

(2) 疎水クロマトグラフィー用の樹脂担体を洗浄するに際し、溶出液の塩濃度を段階溶出で変化させることを特徴とする疎水クロマトグラフィー用の樹脂担体からパイロジェンを除去する方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、医薬品の分離、精製に用いるイオン交換クロマトグラフィー用或いは疎水クロマトグラフィー用の樹脂担体からパイロジェンを除去する方法に関する。

(従来の技術)

パイロジェン(Pyrogen)は静脈内注射により恒温動物に対して発熱反応を引き起こす発熱性物質の総称であり、このパイロジェンに汚染された血液、輸液及び注射剤を投与すると微量で発熱反応が起こり、悪寒、発熱、戦慄等の現象が見られる。またパイロジェンについては、血管作用、骨髄反応、細胞傷害作用、抗腫瘍作用、致死作用、内毒素過敏症等多くの生体反応も報告されている。

細胞の内毒素であるエンドトキシン(Endotoxin)は最も発熱に関与する物質であり、これがパイロジェンと考えてよく、特に大腸菌、サルモネラ菌、赤痢菌、緑膿菌、雲菌等、グラム陰性菌の細胞壁リン脂質多糖体(Lipopolysaccharide: LPS)の発熱性が強力である。

そのために注射剤製造等の医薬分野では、パイロジェン汚染を防ぐことが重要な問題となっている。

従来、パイロジェンの除去方法としては、加熱による方法、吸着による方法、イオン交換による

方法、逆浸透又は限外濾過による方法、 γ 線又は超音波による方法、酸又はアルカリによる方法、酸化還元による方法、化学的修飾による方法等が提案されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

一方、医薬品等を製造する際には、有効物質の分離、精製が不可欠であり、イオン交換クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィー等の手法が用いられている。

ところが、バイロジェンの主成分であるリボポリサッカライドは、高分子素材からなる膜表面や微細構造中に吸着されやすい性質を持っており、従って、分離、精製に用いる樹脂等にバイロジェンが吸着され、蓄積される。この吸着、蓄積されたバイロジェンは、従来の酸やアルカリによる洗浄では十分に溶出除去出来ず、再度この樹脂を用いてクロマトグラフィーを行う際に、有効物質と共にバイロジェンが溶出されると言う問題があった。

本発明は、医薬品等を製造する際に有効成分の

分離、精製に用いるイオン交換クロマトグラフィー或いは疎水クロマトグラフィーに用いる樹脂担体から、バイロジェンを有効に除去する方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、溶出液の塩濃度を段階溶出で変化させることにより、イオン交換クロマトグラフィー或いは疎水クロマトグラフィーに用いる樹脂担体からバイロジェンを除去するものである。

本発明は、樹脂担体を通常の酸又はアルカリ、アルコール等による洗浄を行った後にも、残存するバイロジェンを除去することができる。

塩としては、例えばイオン交換クロマトグラフィーには、食塩等が、疎水クロマトグラフィーには、硫酸アンモニウム等が用いられる。溶出液の塩濃度は樹脂担体の種類やこれに含まれるバイロジェンの濃度によって変えることができ、特に本発明では一段階または二段階以上の段階溶出で変化させる。溶出液の塩濃度は、各段階溶出において繰り返し同じ濃度で、または繰り返し変化させ

た異なる濃度、或いは漸進的に減少させた濃度で利用できる。

本発明で用いられるイオン交換クロマトグラフィーのイオン交換樹脂及び疎水クロマトグラフィーの樹脂担体は、特に限定されるものではない。
〔発明の効果〕

本発明によると、医薬品等を製造する際に有効成分の分離、精製に用いるイオン交換クロマトグラフィー用或いは疎水クロマトグラフィー用樹脂担体から通常のアルカリ及びアルコールによる洗浄で許容量以下に除くことのできないバイロジェンを効果的に除去できる。特に、イオン交換クロマトグラフィー或いは疎水クロマトグラフィーを行う際に、バイロジェンと同様の挙動を示す物質の分離、精製工程で、バイロジェン汚染を極めて低く抑えることができる。

〔実施例〕

以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明する。

樹脂担体の前処理

イオン交換クロマトグラフィー用及び疎水クロマトグラフィー用の樹脂担体それぞれに、0.2 N 水酸化ナトリウム-95%エチルアルコールを加えて攪拌した後、静置して上清液を捨て、再度0.2 N 水酸化ナトリウム-95%エチルアルコールを加えて一夜放置した。翌日、上清液を捨て、バイロジェン・フリー水を加えて攪拌した後、静置して上清液を捨て、再度バイロジェン・フリー水を加えて攪拌した後、静置して上清液を捨てた。この操作を数回繰り返して、水酸化ナトリウム-エチルアルコールをバイロジェン・フリー水に置換した。

一方樹脂担体を充填する各カラムについても、バイロジェン・フリー水を流して洗浄した後、上記の通り前処理した樹脂をカラムに充填した。そして、バイロジェン・フリー水を一夜（約10時間）通液したものを用いた。

実施例1

上記の通り前処理した樹脂担体（三菱化成工業社製、SEPABEADS FPシリーズ、FP-DA 13）5,400

mlを充填したイオン交換クロマトグラフィー用カラム(φ25cm×11cm)に、20℃にて流速1cm/分の割合で、1M食塩水を通液後、バイロジェン・フリー水を通液することを順次3回繰り返した(第1図参照)。

各回の食塩水を通液後の溶出液中のエンドトキシンの量は、一回目の操作により溶出除去した量が40.1μg、二回目の操作により溶出除去した量が7.48μg、三回目の操作により溶出除去した量が2.20μgで、合計49.78μgのエンドトキシンを溶出除去できた。

このエンドトキシンを溶出除去したカラムを用いて、エンドトキシン630μgを含む核酸系の物質を精製したところ、目的画分に含まれるエンドトキシンの量は、60μg(除去率90.5%)であった。

一方、前処理のみを行い、エンドトキシンの溶出除去を行わないカラムを用いて、同様にエンドトキシン630μgを含む核酸系の物質を精製したところ、目的画分に含まれるエンドトキシンの量は、110μg(除去率90.5%)であった。

いて、エンドトキシン9,450ngを含む核酸系の物質を精製したところ、目的画分に含まれるエンドトキシンの量は、990ng(除去率89.5%)であった。

一方、前処理のみを行い、エンドトキシンの溶出除去を行わないカラムを用いて、同様にエンドトキシン9,450ngを含む核酸系の物質を精製したところ、目的画分に含まれるエンドトキシンの量は、2,780ng(除去率70.6%)であった。

この結果から、前処理を行った後、エンドトキシンを溶出除去することにより、目的物質へのエンドトキシン混入量を低く抑えることができたといえる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明実施例1による食塩水の濃度変化によるエンドトキシン除去量を示すグラフ、

第2図は、本発明実施例2による硫酸アンモニウム水溶液の濃度変化によるエンドトキシン除去量を示すグラフである。

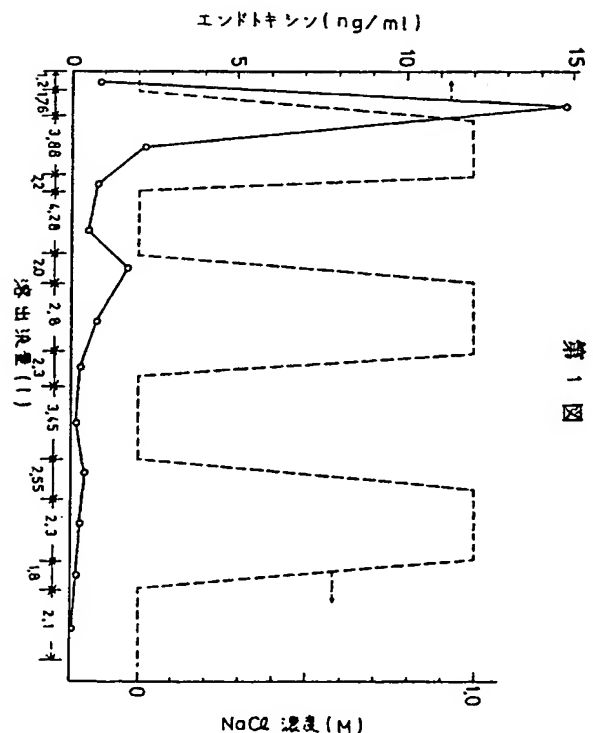
この結果から、前処理を行った後、エンドトキシンを溶出除去することにより、目的物質へのエンドトキシン混入量を低く抑えることができたといえる。

実施例2

上記の通り前処理した樹脂担体(三菱化成工業社製、SEPABEADS FPシリーズ、FP-PH 12)3,700mlを充填した疎水クロマトグラフィー用カラム(φ11.3cm×37cm)に、2.3M硫酸アンモニウム水溶液で平衡化した後、20℃にて流速1cm/分の割合で、バイロジェン・フリー水を通液後、2.3M硫酸アンモニウム水溶液を通液することを順次3回繰り返した(第2図参照)。

各回のバイロジェン・フリー水を通液後の溶出液中のエンドトキシンの量は、一回目の操作により溶出除去した量が1,689.4ng、二回目の操作により溶出除去した量が595.3ng、三回目の操作により溶出除去した量が378.2ngで、合計2,662.9ngのエンドトキシンを溶出除去できた。

このエンドトキシンを溶出除去したカラムを用



第1図

